

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : G01N 33/543, 33/80, C12Q 1/68 G01N 33/577, B03C 1/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/23754 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. November 1993 (25.11.93)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE93/00427 (22) Internationales Anmeldedatum: 11. Mai 1993 (11.05.93)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: P 42 16 345.5 16. Mai 1992 (16.05.92) DE P 42 22 573.6 9. Juli 1992 (09.07.92) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: AHLERT, Dorothee [DE/DE]; Schöppingenweg 8, D-4400 Münster (DE). HOLZGREVE, Wolfgang [DE/DE]; Hedwigstr. 5, D-4400 Münster (DE). GARRITSEN, Hendrikus, Stephanus, Paulus [DE/DE]; Sertürnerstr. 13, D-4400 Münster (DE).			
(74) Anwälte: HABEL, H.-G. usw.; Am Kanonengraben 11, Postfach 34 29, D-4400 Münster (DE).			

(54) Title: PROCESS FOR THE PRENATAL DIAGNOSIS OF GENETIC ABNORMALITIES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR PRÄNATALDIAGNOSTIK GENETISCHER ANOMALIEN

(57) Abstract

It has been possible to demonstrate clearly both in umbilical cord blood samples and after the separation of pregnancy blood that the combination of the triple gradient and MACS with anti-CD71 marked cells is a very effective method of enriching nucleated erythrocytes. The proportion of nucleated erythrocytes in the umbilical cord blood was between 72 and 89 % after both enrichment methods. It has been possible to detect nucleated erythrocytes in the positive fraction according to the triple gradient and MACS in all cases in pregnant women at various gestation stages. The variation in the number of enriched nucleated erythrocytes in various pregnancies very probably reflects individual differences in the foeto-maternal cell ratio at various stages in pregnancy. The process described here makes it possible in normal male blood and that of non-pregnant women to demonstrate no nucleated erythrocytes, by contrast with pregnant women at various stages of gestation. The method is also highly reproducible and suitable for clinical diagnosis. With fluorescence *in situ* hybridisation it has been possible to detect a foetal trisomia in all three cases investigated. The enrichment of nucleated erythrocytes is thus strong enough to diagnose infantile aneuploids using fluorescence *in situ* hybridisation. It is therefore obvious that it is possible with this only slightly invasive and relatively simple and economical method to conduct screening examinations for three of the most important trisomies (13, 18 and 21) and monogenic diseases (with the aid of the PCR) with virtually no risk to the patient and the child.

(57) Zusammenfassung Sowohl in Nabelschnurblutproben als auch nach der Separation von Schwangerenblut konnte klar nachgewiesen werden, daß die Kombination des Dreifachgradienten und MACS mit anti-CD71 markierten Zellen eine sehr effektive Methode zur Anreicherung von nukleierten Erythrocyten ist. Im Nabelschnurblut lag der Anteil nukleierten Erythrocyten nach den beiden Anreicherungstechniken zwischen 72- und 89 %. Bei schwangeren Frauen verschiedener Gestationsalter konnten nukleierte Erythrocyten in der Positivfraktion nach Dreifachgradient und MACS in allen Fällen nachgewiesen werden. Die Variation in der Anzahl angereicherter nukleierter Erythrocyten in verschiedenen Schwangerschaften reflektiert höchstwahrscheinlich individuelle Unterschiede des feto-maternalen Zellverhältnisses in verschiedenen Gestationsaltern. Mit der hier beschriebenen Technik konnten im normalen männlichen Blut und Blut nichtschwangerer Frauen keine nukleierten Erythrocyten nachgewiesen werden im Gegensatz zu Schwangeren verschiedener Gestationsalter. Die Methode ist also gut reproduzierbar und geeignet für die klinische Diagnostik. Mit der Fluoreszenz In situ Hybridisierung gelang ein Nachweis einer fetalen Trisomie in allen drei untersuchten Fällen. Die Anreicherung nukleierter Erythrocyten ist also stark genug, um einen diagnostischen Nachweis kindlicher Aneuploidien mit Hilfe der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung zu führen. Es ist daher naheliegend, daß man mit dieser wenig invasiven und relativ einfach und kostengünstig durchzuführenden Methode eine Screeninguntersuchung auf die drei wichtigsten Trisomien (13, 18 und 21) sowie Einzelgenerkrankungen (mit Hilfe der PCR) anbieten könnte, die praktisch keine Gefahr für die Patientin und das Kind bedeutet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	I.K	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FI	Finnland				

"Verfahren zur Pränataldiagnostik genetischer Anomalien"

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Pränataldiagnostik genetischer Anomalien.

Aus der FR 2 657 167 ist ein nichtdiagnostisches
5 Screening-Verfahren bekannt, bei dem für die Screeninguntersuchungen nur mütterliches Serum verwendet wird. Auf diese Weise kann ein altersbedingtes Risiko für Morbus Down rechnerisch modifiziert werden, wobei durch diese Untersuchungen jedoch nur ein relatives Risiko für das Down Syndrom geschätzt werden kann.
10

Im übrigen ist es seit ca. 20 Jahren möglich, vorgeburtlich genetische Anomalien zu diagnostizieren.
15 Die zur Zeit zur Verfügung stehenden Techniken zur

- 2 -

Aspiration kindlichen Gewebes während der Schwangerschaft sind die Fruchtwasserpunktion (Amniozentese) und die sog. Chorionzottenbiopsie. Die Chorionzottenbiopsie kann bereits ab der 8., die Amniozentese ab der 14. Schwangerschaftswoche durchgeführt werden. Die Invasivität dieser konventionellen Methoden bedingt jedoch, daß Eingriffsrisiken für den Feten (z. B. Fehlgeburt oder Verletzung) aber auch für die Mutter (z. B. Entzündungen in der Gebärmutter) bestehen. Eine randomisierte Kontrollstudie wies nach, daß sogar durch eine Amniozentese, die von vielen als die sicherere Aspirations-technik angesehen wird, das Risiko eines Spontanabortes eingriffsbedingt um ca. 1 % steigt (Holzgreve W., Miny P : Genetic aspects of fetal disease. Semin Perinatal 13: 260, 1989). Deshalb wird zur Zeit eine Untersuchung auf eine spontan auftretende sogenannte kindliche Trisomie (Überzähliges Chromosom) nur bei Müttern mit erhöhtem Risiko, z. B. erhöhtem mütterlichen Alter durchgeführt. Ein invasiver Eingriff wird in Deutschland erst bei Schwangeren ab dem 36. Lebensjahr durchgeführt, weil das Eingriffsrisiko bei jüngeren Schwangeren im Normalfall höher ist, als die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer kindlichen Trisomie. Deshalb besteht seit vielen Jahren eine starke Motivation zur Entwicklung einer weniger invasiven Technik zur Pränataldiagnostik. Obwohl eine Vielzahl von Versuchen in der Vergangenheit unternommen wurde, diese Hoffnung zu verwirklichen, war keine der bisher versuchten Techniken erfolgreich.

Vermutlich gelangen im Laufe einer Schwangerschaft einige wenige kindliche Zellen, als Folge feto-

- 3 -

maternaler Transfusion, in den mütterlichen Kreislauf. Das Verhältnis kindlicher zu mütterlichen kernhaltigen Zellen im Blut einer Schwangeren ist aber extrem niedrig und wird zur Zeit auf ca. 1 in 5 10^9 bis 1 in 10^{11} Zellen geschätzt (Holzgreve W, Gänshirt-Ahlert D, Burschky M et al.: Detection of fetal DNA in maternal blood by PCR. Lancet 335: 10 1220, 1990). Wegen dieser hohen Verdünnung kindlicher Zellen ist es ohne vorherige Anreicherung bisher noch nicht gelungen, das genetische Material des Feten aus mütterlichem Blut reproduzierbar nachzuweisen (Holzgreve W, Garritsen HSK, Gänshirt-Ahlert D: Fetal cells in maternal circulation. J Reprod Med 37 (5): 410, 1992, nicht vorveröffentlicht)

Wenn es möglich wäre, diese fetalen Zellen aus der mütterlichen Zirkulation zu isolieren, wäre durch eine einfache Blutentnahme der Zugang zu einer 20 Pränataldiagnostik möglich. Hierdurch würde das durch den konventionellen Eingriff bedingte Risiko für Mutter und Kind entfallen. Zusätzlich würde eine Blutentnahme gegenüber der heute üblichen Amniozentese bzw. Chorionzottenbiopsie eine erhebliche 25 Kostensenkung bedeuten. Amniozentesen werden nur von besonders dafür ausgebildeten Frauenärzten durchgeführt und die neuere Chorionzottenbiopsie wird zur Zeit in Deutschland nur in wenigen speziell dafür eingerichteten Zentren angeboten. Da alle kernhaltigen Zellen die gesamte genetische Information 30 enthalten, können aus kindlichen Blutzellen nach erfolgreicher Isolation aus mütterlichem Blut dieselben genetischen Aberrationen nachgewiesen werden, wie nach konventioneller Aspiration fetaler Zellen.

35 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, genetische

- 4 -

Anomalien pränatal nachzuweisen.

Die Lösung der Aufgabe besteht aus einer Kombination folgender Schritte:

5

a) Voranreicherung kindlicher Zellen aus mütterlichem Vollblut durch einen Mehrfach-Dichte-Gradienten.

10 b) Markierung der kindlichen Zellen mit einem monoklonalen Antikörper und/oder Markierung mütterlicher Zellen mit entsprechenden spezifischen Antikörpern mit magnetischen Beads und Anreicherung der markierten fetalen Zellen
15 bzw. Depletion der mütterlichen Zellen durch magnetische Separation.

c) Nachweis kindlicher genetisch bedingter Anomalien durch molekulargenetische Nachweismethoden.
20

Die Konzentration der fetalen Zellen kann also entweder durch deren Anreicherung erfolgen oder über die Depletion der mütterlichen Zellen.

25

Vorteilhaft können die kindlichen Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Transferrinrezeptor markiert werden.

30

Vorzugsweise werden als kindliche Zellen nukleierte Erythrocyten angereichert und als monoklonaler Antikörper wird ein "anti - CD71" eingesetzt.

35

Als kindliche Zellen können auch Trophoblasten angereichert werden oder gemäß einem weiteren Vorschlag

- 5 -

der Erfindung Lymphocyten.

Der Nachweis kindlicher genetisch bedingter Anomalien erfolgt vorzugsweise als Nachweis kindlicher Chromosomenstörungen durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden.

Die Voranreicherung kindlicher Zellen aus mütterlichem Vollblut kann durch einen Dreifach-Ficoll-Gradienten erfolgen, mit dem gute Ergebnisse erzielt wurden. Die Verwendung anderer Dreifach- oder Vielfach-Gradienten ist jedoch denkbar, z. B. die Verwendung eines Dreifach-Percoll-Gradienten.

Die Anreicherung der markierten fetalen Zellen durch einen magnetisch aktivierten Zellsorter (MACS) hat gute Ergebnisse erbracht und ist preisgünstig. Sie kann jedoch alternativ beispielsweise auch mit Hilfe sogenannter "Dynabeads" erfolgen, bei denen mit einem offenen Reagenzgefäß und einem außerhalb des Reagenzgefäßes angebrachten Magneten gearbeitet wird.

Die Untersuchung der Zellzusammensetzung fetalen Blutes zeigt, daß nukleierte Erythrocyten in der frühen Entwicklung (bis zur 20. Schwangerschaftswoche) den überwiegenden Anteil der kernhaltigen Zellen in der fetalen Zirkulation ausmachen. Erst im späteren Verlauf der Schwangerschaft nimmt die Anzahl der weißen Blutkörperchen (Lymphocyten) zu. Dies beruht auf der speziellen Ontogenese der fetalen Blutbildung, die im Laufe der Schwangerschaft in verschiedenen Entwicklungsphasen in unterschiedlichen Organen stattfindet.

- 6 -

Da die Pränataldiagnostik wegen eines in Frage kommenden Abbruchs der Schwangerschaft so früh wie möglich erfolgen sollte, erscheint die Isolierung nukleierter Erythrocyten zur Entwicklung einer pränataldiagnostischen Methode am vielversprechendsten.

Es ist auch bekannt, daß das Blut normaler Erwachsener keine kernhaltigen, sondern nur kernlose Erythrocyten enthält, so daß kernhaltige Erythrocyten spezifisch für das fetale Blut sind (Holzgreve W, Garritsen HSK, Gänshirt-Ahlert D: Fetal cells in maternal circulation. J. Reprod Med 37: 410, 1992).

In jüngerer Zeit wurde eine Methode publiziert, die durch Verwendung eines Zweistufengradienten aus fetalem Vollblut mononukleäre weiße Blutkörperchen von nukleierten roten Blutkörperchen abtrennen kann (Bhat MM, Bieber M, Teng NNH: One step separation of human fetal lymphocytes from nucleated red blood cells. J Immun Meth 131 : 147. 1990). In Abwandlung dieser Technik benutzt die Erfindung einen effektiveren Dreifachgradienten, um nukleierte Erythrocyten aus mütterlichem Blut voranzureichern. Es entstehen dabei nach Zentrifugation von Vollblut über einen Dreifachgradienten aus Ficoll drei distinkte Zellschichten, von denen die mittlere Zellschicht nukleierte Erythrocyten enthält. Wir konnten nachweisen, daß die Anreicherung dieser Zellen um so effektiver ist, je verdünnter diese im Vollblut vor der Zentrifugation sind.

Untersuchungen an Knochenmarkszellen Erwachsener, die kernhaltige Vorläuferzellen der Erythrocyten

- 7 -

enthalten, ergaben, daß diese auf den Zellmembranen einen sogenannten Transferrinrezeptor exprimieren (Horton MA: Expression of transferrin receptors during erythroid maturation. *Exp Cell Res* 144: 361, 5 1983). Der Transferrinrezeptor ist ein Membranprotein, das für den Eisentransport in die Zelle verantwortlich ist; er kann mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers (anti-CD 71) nachgewiesen werden. Eine konventionelle Methode zur Anreicherung antikörper-markierter Zellen aus einem 10 Zellgemisch ist die Verwendung eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters (FACS). Zusätzlich zur Antikörpermarkierung werden hierbei die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Das 15 FACS-Gerät kann die fluoreszierenden Zellen von den nicht markierten Zellen unterscheiden und voneinander trennen. Mit Hilfe dieser Methode ist es in jüngster Zeit gelungen, fetale Zellen aus mütterlichem Blut anzureichern (Bianchi DW, Flint AR, Pizzimenti MF et al: Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *PNAS* 87: 20 3279. 1990; Price J0, Elias S, Wachtel SS: Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1731. 1991). Allerdings ist ein FACS Gerät sehr kostspielig (ca. DM 800.000,--) und kann nur von einem dafür spezialisierten langjährig 25 ausgebildeten Mitarbeiter bedient werden.

30 Da durch diesen erheblichen finanziellen und personellen Aufwand der Einsatz eines FACS Gerätes bei pränataldiagnostischen Routineuntersuchungen einen erheblichen Nachteil mit sich bringen würde, wird gemäß der Erfindung vorgeschlagen, die antikörper-markierten Zellen mit Hilfe eines in jüngerer Zeit 35

- 8 -

entwickelten magnetisch-aktivierten Zellsorters (Miltenyi A., Müller W., Weichel A.: High Gradient magnetic cell separation with MACS - Cytometry 11:231. 1990.) anzureichern. Bei dieser Technik
5 werden die antikörper-markierten Zellen zusätzlich mit magnetischen Beads beladen. Der MACS besteht aus einem starken Magneten, in dessen Feld eine mit Stahlwolle gefüllte Spritze eingebracht wird. Über diese wird das Zellgemisch nach Antikörper- und
10 Beads-Markierung gegeben und die negativen, nicht mit magnetischen Beads beladenen Zellen werden herausgewaschen, während die positive Zellfraktion an der Stahlwolle haften bleibt. Anschließend wird die Spritze aus dem Magnetfeld entfernt und die
15 Positivfraktion, die die markierten Zellen enthält, herausgespült. Die Verwendung des magnetisch aktivierte Zellsorters bietet den Vorteil, daß er sehr einfach zu bedienen ist und die Kosten der Anschaffung (ca. DM 10.000,--) weit unter denen
20 eines FACS Gerätes liegen.

Als Nachweis der kindlichen Herkunft der angereichten Zellen diente die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Mit dieser Technik können
25 fluoreszenzmarkierte Gensonden, die spezifisch für ein Chromosom sind, auf einem Objektträger mit der DNA fixierter Kerne hybridisiert werden. Die Spezifität der DNA-DNA Hybridisierung erlaubt einen spezifischen Nachweis der Gene in den DNA-haltigen
30 Kernen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ist eine erfolgte Hybridisierung durch ein distinktes fluoreszierendes Signal in den Kernen erkennbar. Bei einem normalen menschlichen Chromosomensatz sind mit einer chromosomen-spezifischen Probe der Autosomen
35 (Nicht-Geschlechtschromosomen) zwei distinkte Sig-

- 9 -

nale in den Kernen zu erkennen. Bei einem aberranten Chromosomensatz mit einem überzähligen Chromosom (Aneuploidie) kann man mit dieser Methode durch eine chromosomen-spezifische Gensonde 3 Signale nach-

5 weisen. Wir verwendeten die Fluoreszenz in situ Hybridisierung zum Nachweis einer kindlichen Aneuploidie nach Anreicherung fetaler Zellen aus dem Blut schwangerer Frauen, die einen Feten mit bekannter Chromosomenanomalie austrugen.

10 Diese Methode wurde gewählt, weil Aneuploidien die häufigste Ursache für genetische Fehlbildungen darstellen und einer Diagnose dieser Anomalien in der Schwangerschaft daher eine große Bedeutung zukommt.

15 Besonders wichtig ist der Nachweis einer Trisomie der Chromosomen 13, 18 und 21, sowie Aneuploidien der Chromosomen X und Y. Dieses sind die einzigen Trisomien, die zur Geburt eines Feten führen können, die allerdings in allen drei Fällen schwer 20 geschädigt sind. Eine wenig risikoreiche Technik zur Aspiration fetalen Gewebes aus mütterlichem Blut würde daher eine Screeninguntersuchung auf eine dieser häufigsten genetischen Erkrankungen auch bei jungen Frauen ermöglichen.

25 Die Erfindung wird nachstehend in Verbindung mit den Tabellen und den Abbildungen an einem Ausführungsbeispiel erläutert. Es zeigt:

30 Tab. 1: Schwangerschaftsgeschichte, Probenentnahme und Ergebnisse,
Tab. 2: Auswertung der Anreicherung von nukleierten Erythrocyten,
Tab. 3: Hybridisierungssignale in Zellen aus
35 mütterlichem Blut,

ERSATZBLATT

- 10 -

Abb. 1: Prozentsatz der Zellen mit drei Signalen und

Abb. 2: Differentielle Zellzählungen.

5 Blutproben

Vierzig ml heparinisiertes Vollblut wurde von neun schwangeren Frauen abgenommen. Drei dieser Frauen trugen einen Feten mit einer Trisomie 18 aus

10 (Tab. 1).

Zur Kontrolle wurden zusätzlich jeweils 10 ml heparinisiertes Nabelschnurblut von vier normalen Neugeborenen und einem Neugeborenen mit einer Trisomie 18 untersucht. Nabelschnurblut ist immer kindlicher Herkunft.

Als Kontrolle wurden jeweils 40 ml Blut von drei nichtschwangeren Frauen und drei Männern untersucht.

20

Das Blut sollte vor der Verarbeitung nicht älter als 12 Stunden sein.

Zur gesonderten Bestimmung der Effektivität des
25 Dreifachgradienten wurde Nabelschnurblut in Erwachsenenblut in einer Serie so verdünnt, daß das Verhältnis kernhaltiger Zellen von 1 : 10 bis 1 : 50.000 abnimmt, und anschließend ein Dreifachgradient mit jeder einzelnen Verdünnung durchgeführt.

30

Dreifachgradient

Jeweils 2 ml heparinisiertes Vollblut werden mit

35 4 ml PBS Puffer (8.42 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.299 g

- 11 -

KH_2PO_4 , 0.92 g NaHPO_4 , ad 1000 ml aqua dest.) ge-

misch und in ein 12 ml Zentrifugenröhren gegeben.

Mit einer langen Kanüle werden nacheinander vor-

sichtig jeweils 2 ml Ficoll-Histopaque (Sigma,

5 München) folgender Dichten unterschichtet: Ficoll-

Histopaque 1077, 1110 und 1119. Das Ficoll der

Dichte 1110 wird aus entsprechenden Anteilen der

Dichten 1077 und 1119, die beide bei Sigma (München)

erhältlich sind, gemischt. Die Gradienten werden

10 30 min bei 550g zentrifugiert. Es sind dann folgende

drei distinkte Zellschichten in dem klaren Ficoll-

überstand zu sehen:

Eine obere Schicht, die Lymphocyten und Monozyten

15 enthält,

eine mittlere Bande, die nukleierte Erythrocyten

enthält,

20 eine untere Bande mit neutrophilen Granulozyten.

Bei Blut aus Schwangeren ist die Zellzahl der ange-

reicherten Zellen so gering, daß sie nicht sichtbar

ist, ihre Lage ist jedoch an dem Übergang der beiden

25 Ficollsichten unterschiedlicher Dichte gut zu er-

kennen. Am Boden des Zentrifugationsröhrens be-

findet sich ein dicker roter Saum kernloser Erythro-

cyten. Über den Ficollsichten liegt eine gelbliche

Schicht mit Blutserum. Nacheinander werden mit einer

30 10 ml Spritze und einer TSK Subra Einmalkanüle,

0.9 x 120 (Ehrhardt, Geislingen) das Blutserum, die

obere, die mittlere und untere Bande von dem

Gradienten abgenommen. Die unterste Zellschicht mit

den nicht kernhaltigen Erythrocyten wird verworfen.

35 Die mittlere Bande, die die angereicherten nukleier-

- 12 -

ten Erythrocyten enthält, wird mit 5 ml PBS-Puffer versetzt und drei mal mit PBS Puffer gewaschen, d. h. jeweils 8 min. bei 550 g zentrifugiert und das Zellpellet erneut mit PBS Puffer versetzt. Danach 5 wird die Zellsuspension auf ca. 2 ml eingeengt, 100 μ l entnommen und in einer Zytozentrifuge (Shandon, Frankfurt) 5 min. bei 500 g auf einen Objektträger zentrifugiert. Auf dem Objektträger werden die Blutzellen differentiell angefärbt mit 10 einer Diff-Quick Färbelösung (Merz+Dade, DÜdingen, CH). Diese Färbung erlaubt die mikroskopische Unterscheidung der verschiedenen Blutzellen voneinander. Es wurden auf diese Weise jeweils 100 Zellen nach Separierung durch den Gradienten ausgezählt, um den 15 Erfolg der Anreicherung nukleierter Erythrocyten in der mittleren Zellschicht zu überprüfen.

Antikörperfärbung

20 In einer Thomakammer wurde die Zellzahl der mittleren Bande nach dem Dreifachgradienten bestimmt.

Bei der Verwendung von Nabelschnurblut wurde ein Aliquot dieser angereicherten Zellsuspension zur 25 Antikörpermarkierung eingesetzt, das einer Zellzahl von 10^7 Zellen entsprach.

Die Zellen wurden 10 min. bei 200 g zentrifugiert und das Pellet in 50 μ l PBS Puffer, der 10 % Serum 30 enthält, aufgenommen. Das Serum wird nach dem Dreifachgradienten entnommen und vor der Verwendung 45 min. bei 56° C inkubiert. Die Verwendung des Serums bei der Antikörperinkubation verhindert die unspezifische Markierung von Monozyten.

- 13 -

Zu den 50 μ l der Zellsuspension werden 50 μ l "anti-CD71" (Becton-Dickenson) gegeben und das Gemisch 10 min. bei 8° C inkubiert. Anschließend werden 20 μ l rat-anti-mouse IgG 2 (a+b) magnetische Micro-beads (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) dazugegeben und das Gemisch weitere 15 min. bei 8° C inkubiert. Nach Zentrifugation (200 g, 10 min.) wird der Überstand abgenommen und die Zellen in 500 μ l PBS/0.5 % BSA (bovine serum albumine, Fluka, Buchs) resuspendiert.

Eine A2 Säule der Firma Milenyi Biotech, die mit Stahlwolle gefüllt ist und sich zur Separation von ca. 10⁷ Zellen eignet, wird für die Zelltrennung wie folgt vorbereitet: An das untere Ende der Säule wird ein Dreiwegehahn angeschlossen und an den seitlichen Eingang eine mit 70 %igem Ethanol gefüllte 10 ml Spritze angesetzt. Das Ethanol wird von unten in die Säule hineingedrückt, bis der Flüssigkeitsspiegel den oberen Rand der A2 Säule erreicht hat. Der Dreiwegehahn wird geschlossen und von oben eine 100 ml Spritze mit Gewinde auf die Säule aufgeschraubt, die Aqua dest. enthält. Der Dreiwegehahn wird geöffnet, so daß die Säule nach unten auslaufen kann und mit Aqua dest. durchgespült wird. Anschließend wird die Säule mit PBS/0.5 % BSA durchgespült und das PBS/BSA Gemisch durch rechtzeitiges Schließen des Hahns in der Säule belassen, so daß der Puffer ca. 1 cm über der Stahlwolle steht. Durch diese Behandlung gelingt es, die Säule luftblasenfrei mit PBS/BSA Puffer zu füllen. Vorhandene Luftblasen würden eine spätere Bindung der Zellen an die Stahlwolle verhindern. Das PBS/BSA Gemisch muß 30 min. in der Säule verbleiben, damit sie mit BSA abgesättigt wird, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

- 14 -

Vor der Zellseparation wird die Säule an dem Magneten befestigt und durch Öffnen des Dreiwegehahns der Puffer so weit entfernt, daß der Flüssigkeitsspiegel kurz über der Stahlwolle steht. Von oben
5 werden die $500\mu\text{l}$ Zellsuspension nach Antikörperfärbung auf die Säule pipettiert und der Hahn so lange geöffnet, bis der obere Rand des Flüssigkeitsspiegels wieder fast die Stahlwolle erreicht hat. Danach werden 6 Fraktionen von jeweils $500\mu\text{l}$ PBS/0.5 % BSA
10 hinzugegeben und die Säule damit gewaschen. Diese Negativfraktion wird mit einer Nadel der Stärke 24 G eluiert und in einem Zentrifugenröhren gesammelt. Danach wird der Dreiwegehahn geschlossen und die Säule aus dem Magneten entfernt. Unten an dem Hahn
15 wird seitlich eine Spritze mit PBS/0.5 % BSA befestigt. Nach Öffnen des Hahns wird der Puffer mit der Spritze so weit in die Säule gepreßt, daß die Zellsuspension den oberen Säulenrand erreicht. Nach Schließen des Dreiwegehahns wird diese wieder in dem
20 Magneten befestigt und eine Nadel der Stärke 22 G unten angebracht. Die Säule wird dann erneut 6 mal mit jeweils $500\mu\text{l}$ PBS/0.5 % BSA eluiert, diese Fraktion wird als Waschfraktion gesammelt. Nach dem Schließen des Dreiwegehahns wird die Säule aus dem
25 Magneten entfernt, bis zum oberen Rand mit PBS/0.5 % BSA Puffer gefüllt und oben eine ebenfalls mit 3 ml PBS/BSA Puffer gefüllte Spritze aufgesetzt. Nach Entfernen der Nadel wird durch Druck auf die Spritze die "Positivfraktion" nach unten ausgespült.
30 Von allen drei Fraktionen "Negativ-", "Wasch-" und Positivfraktion" wurden Aliquots zur Zellzahlbestimmung und Zytozentrifugation entnommen. Im Anschluß an die Zytozentrifugation wurden die Objektträger differentiell angefärbt und bei Nabelschnur-
35

- 15 -

blut jeweils 100 Blutzellen ausgezählt, um die erfolgte Anreicherung zu überprüfen. Bei Schwangerenblut wurden alle Zellen des gesamten Zytospins ausgezählt.

5

Fluoreszenz In Situ Hybridisierung

Die positive Fraktion der magnetischen Zellseparation wurde zur Isolation der Interphasekerne

10 10 min. bei 200 g zentrifugiert, das Pellet in 5 ml 75 mM KCL resuspendiert und 10 min. bei 37° C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min. 150 g) wurde das Zellpellet vorsichtig in 5 ml Methanol/Eisessig (3 : 1/v : v) resuspendiert und 10 min. bei 200 g
15 zentrifugiert. Das Pellet wurde in dem Rücklauf des Methanol/Eisessig resuspendiert und mit einer Glaspasteurpipette auf einen Objektträger aufgetropft.

Die anschließende Fluoreszenz in situ Hybridisierung

20 mit einer DNA Sonde, die spezifisch für das Chromosom 18 ist, erfolgte mit einem Kit der Firma Oncor (Gaithersburg, USA) nach den Anweisungen des Herstellers.

25 Die Kerne wurden nach der in situ Hybridisierung unter einem Zeiss Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet und mit einem Kodak Ectachrom 64 ASA Film fotografiert.

30 Ergebnisse

Die Ergebnisse differentieller Zellzählungen vor und nach dem Dreifachgradienten und nach MACS von sieben Nabelschnurblutproben sind in der Abb. 2 dargestellt.

35 Die starke Anreicherung nach der kombinierten Anwen-

- 16 -

dung beider Methoden ist klar erkennbar. Die Separationseffizienz des Dreifachgradienten steigt signifikant an, wenn die Zahl der nukleierten Erythrocyten in der Vollblutprobe abnimmt. Dies
5 konnte in Untersuchungen von Dreifachgradienten mit Verdünnungsreihen von Nabelschnurblut in Erwachsenenblut nachgewiesen werden (Tab. 2). Man kann also davon ausgehen, daß bei der Separation von Schwangerenblut die Effektivität des Dreifachgradienten
10 deutlich höher ist als dies bei der Anreicherung aus Nabelschnurblut der Fall ist.

Tabelle 1 zeigt die Anzahl nukleierter Erythrocyten, die durch die Kombination beider Separationsmethoden
15 aus dem Blut von neun Schwangeren isoliert werden konnten.

Nach Separation von drei männlichen Kontrollblutproben und drei Blutproben von nichtschwangeren
20 Frauen konnten keine nukleierten Erythrocyten nachgewiesen werden.

Bei drei der untersuchten Schwangerschaften wurde bei bekannter Trisomie 18 des Feten (Tab. 1) im
25 Anschluß an die Zellseparation eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit einer Chromosom 18 spezifischen DNA Sonde durchgeführt. In allen drei Fällen war der Prozentsatz der Zellen mit drei Signalen im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht (Tab. 3).
30 Der Anteil der Zellen mit drei Signalen lag bei 12-, 12- und 14 % in den Fällen mit Trisomie 18. Bei vier Blutproben normaler Neugeborener lag der mittlere Prozentsatz der trisomen Zellen nach FISH bei 2.5 %. Abbildung 1 stellt diese Daten aus drei Schwangerschaften und vier Nabelschnurblutkontrollen dar.
35

- 17 -

Die beiden Verteilungskurven zeigen keine Überlappung und der Unterschied ist hoch signifikant.

Bei Patientin 3 untersuchten wir Nabelschnurblut, das von dem Feten mit Trisomie 18 in utero gewonnen wurde und fanden 70 % der Zellen mit drei Signalen.

Tab.1 Schwangerschaftsgeschichte, Probenentnahme und Ergebnisse

Patient Proben- Nr.	entnahme z. Karyotyp- isierung	SSW bei entnahme bei Proben- entnahme	SSW bei Entnahme mütterl. Bluts	Karyotyp der Schangemisch	vorherige Schwanger- schaften	Zahl müt. Erythrozyten nach Ausreicher,
1	CVS	19	20	nach IUFT	47.XY+18	46.XY
2	CVS	11	14	nach CVS	47.XX+18	46.XY
3	CVS	16	17	nach CVS	47.XX+18	3x 46.XX; 3x sp.ab.
4	CVS	10	10	vor CVS	46.XY	46.XX; 47.XX+13
5	AC	15	15	vor AC	46.XY	477
6	CVS	11	11	vor CVS	46.XY	46.XX; 46.XY
7	CVS	12	12	vor CVS	46.XX	46.XY; 46.XY;
8	AC	20	33	nach AC	47.XY+21	3x 46.XY; sp.ab.
9	CVS	25	30	nach CVS	47.XX+9	14

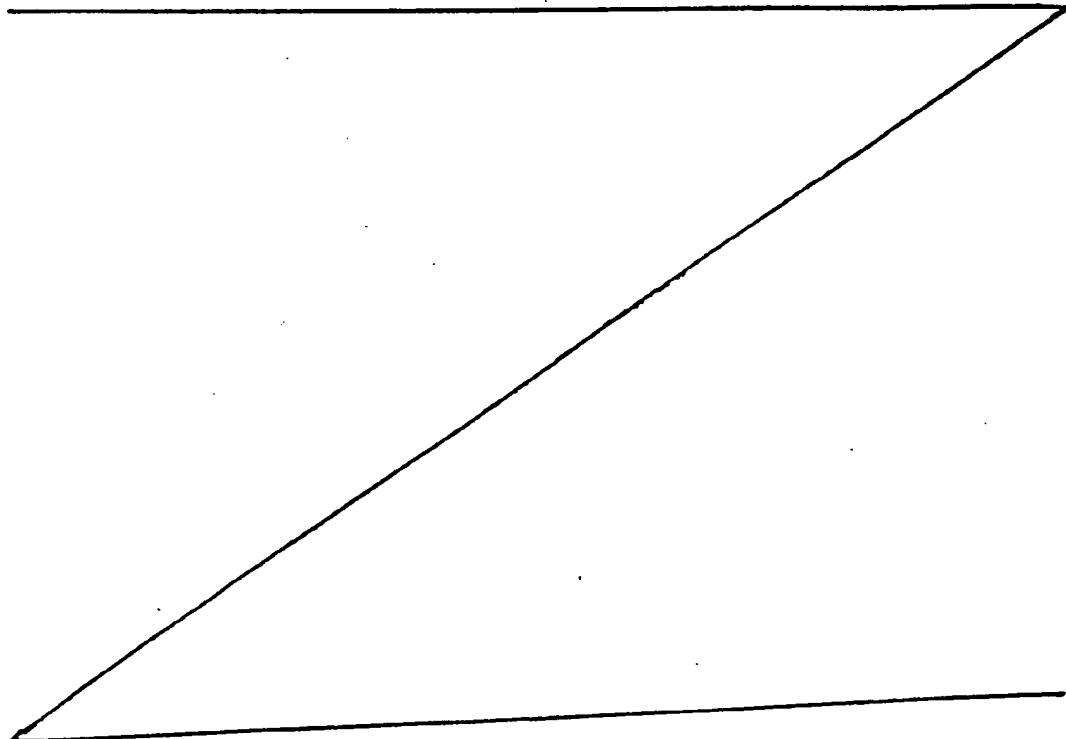
CVS=Chorionzottenbiopsie; AC= Amniozentese; IUFT= Intruteriner Fruchttod;
sp.ab.= Spontanabort; n.a.= nicht auswertbar

- 19 -

Tab.2 Auswertung der Anreicherung von nukleierten Erythrocyten nach Dreifachgradient aus Nabelschnurblut verdünnt in Erwachsenenblut. Die Zahl der nukleierten Erythrocyten wurde auf differentiell gefärbten Zytospins bzw. Blutausstrichen ausgewertet.

% nukleierte Erythrocyten im Blutausstrich	% nukleierte Erythrocyten nach Dreifachgradient Nabelschnurblut verdünnt in weiblichem Blut							
Nabelschnurblut unverdünnt	1:10	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:50000	1:10000	1:500000
4	8	2	1	1	0.2	0	0.1	1 in 2 OT
17	5	1	0	3	0	0	0	3

OT: Objektträger



- 20 -

Tab. 3 Hybridisierungssignale in Zellen aus mütterlichem Blut von 3 Schwangerschaften mit Trisomie 18, einer Nabelschnurblutprobe eines Feten mit Trisomie 18 und 4 Nabelschnurblutproben von Feten mit normalem Chromosomensatz.

Patientin	% und Anzahl der Hybridisierungssignale						Gesamtzellzahl
	0	1	2	3	4	5	
No. 1 (Tris 18)	9%(10)	12%(13)	65%(72)	12%(13)	2%(2)	0%	110
No. 2 (Tris 18)	6%(6)	7%(7)	68%(64)	12%(11)	2%(2)	0%	90
No. 3 (Tris 18)	6%(6)	3%(3)	70%(70)	14%(14)	1%(1)	0%	94
<hr/>							
No. 3 Nabelschnur- blut (Tris 18)	0%	0%	22%(18)	70%(56)	7%(5)	1%(1)	80
<hr/>							
Kontrolle 1 Nabelschnur- blut (46,XY)	3%(7)	8%(16)	78%(161)	2%(4)	2%(2)	0%	190
<hr/>							
Kontrolle 2 Nabelschnur- blut (46,XY)	9% (5)	9% (5)	78% (42)	2% (1)	2% (1)	0%	54
<hr/>							
Kontrolle 3 Nabelschnur- blut (46,XY)	3% (6)	6% (12)	89% (177)	3% (3)	2% (2)	0%	200
<hr/>							
Nabelschnur- blut (46,XX)	5% (9)	5% (9)	88% (176)	3% (5)	1% (1)	0%	200

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Pränataldiagnostik genetischer Anomalien, das die Kombination folgender Schritte umfaßt:
 - a) Voranreicherung kindlicher Zellen aus mütterlichem Vollblut durch einen Mehrfach-Dichte-Gradienten,
 - b) Markierung der kindlichen Zellen mit einem monoklonalen Antikörper und/oder Markierung mütterlicher Zellen mit entsprechenden spezifischen Antikörpern mit magnetischen Beads und Anreicherung der markierten fetalen Zellen bzw. Depletion der mütterlichen Zellen durch magnetische Separation.
 - c) Nachweis kindlicher genetisch bedingter Anomalien durch molekulargenetische Nachweismethoden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung der kindlichen Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Transferrinrezeptor erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als kindliche Zellen nukleierte Erythrocyten angereichert werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als kindliche Zellen Trophoblasten angereicht werden.
- 35 5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch

-22-

gekennzeichnet, daß als kindliche Zellen Lymphocyten angereichert werden.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden
5 Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der monoklonale Antikörper ein "anti - CD71" ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden
10 Ansprüche, gekennzeichnet durch den Nachweis kindlicher Chromosomenstörungen durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit chromosomen-spezifischen DNA Sonden.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden
15 Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Voranreicherung kindlicher Zellen durch einen Dreifach-Ficoll-Gradienten erfolgt.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden
20 Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Anreicherung der markierten fetalen Zellen durch einen magnetisch aktivierten Zell Sorter (MACS) erfolgt.

1/2

(% Zellen mit drei Signalen)

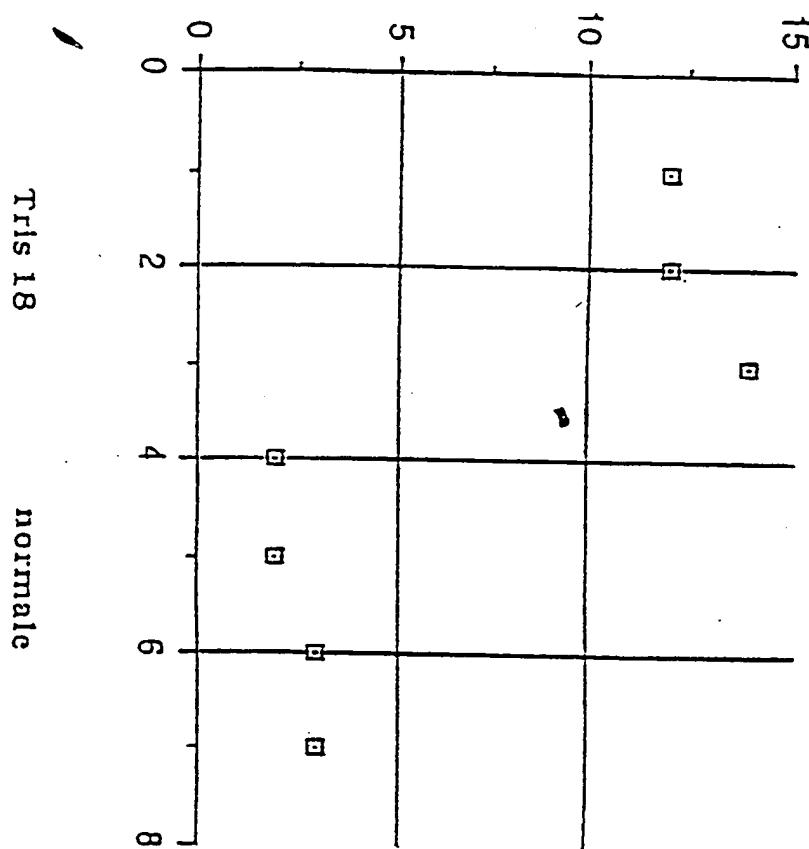
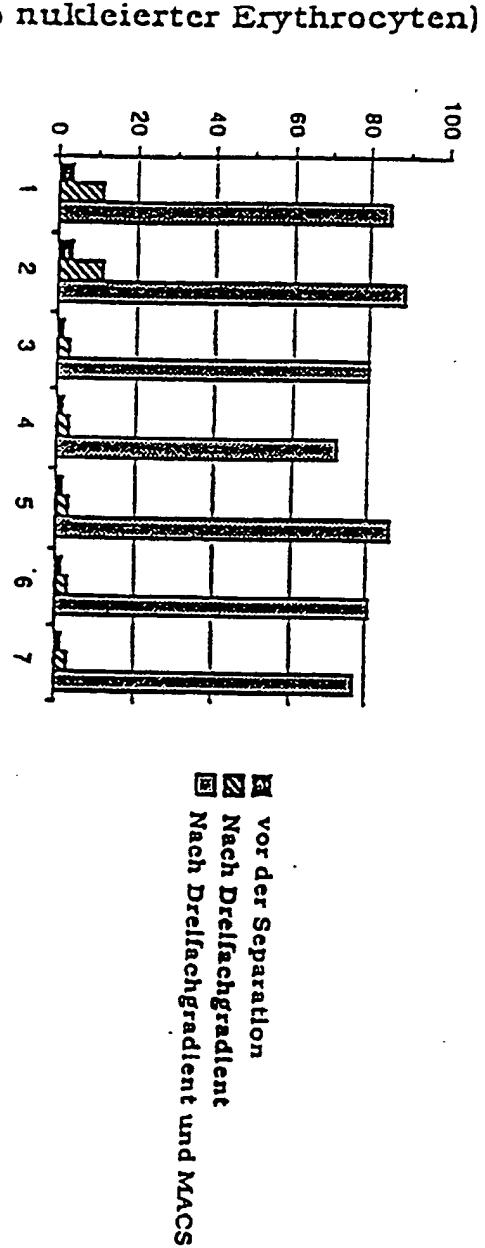


Abb.1 Prozentsatz der Zellen mit drei Signalen nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung

2/2

Abb. 2. Differentielle Zellzählungen in Nabelschnurblut von 7 normalen Neugeborenen



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 93/00427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INT. CL.⁵ G01N33/543; G01N33/80; C12Q1/68; G01N33/577; B03C1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

INT. CL.⁵ G01N ; C12Q ; C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A, 9 006 509 (THE FLINDERS UNIVERSITY OF SOUTH AUSTRALIA) 14 June 1990	1, 4, 7, 9
Y	see the whole document	2, 3, 5, 6, 8
Y	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. Vol. 131, 1990, NEW YORK US, pages 147 - 149 N.M. BHAT ET AL. "One step separation of human fetal lymphocytes from nucleated red blood cells" cited in the application; see the whole document	3, 5, 8
Y	EP, A, 0 079 696 (THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 25 May 1983 see claims 1-2	2, 6
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 113, no. 17, 22 October 1990 Columbus, Ohio, US; abstract no. 150231 G.N.P. VAN MUIJEN ET AL. "Monoclonal antibody PAL-M1 recognizes the transferrin receptor and is a progression marker in melanocytic lesions"	2, 6 -/-

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 1993 (10.08.93)

Date of mailing of the international search report

25 August 1993 (25.08.93)

Name and mailing address of the ISA/
EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 93/00427

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>page 579; column 1; see abstract & J. INVEST. DERMATOL: Vol. 95, No. 1, 1990; pages 65 - 69</p> <p>---</p>	
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 114, No. 21; 27 May 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 205143 P. BØGERCK ET AL. "Expression of CD40 and CD43 during activation of human B lymphocytes" pages 632; column 1; see abstract & SCAND. J. IMMUNOL. Vol. 33, No. 2, 1991, pages 211 - 218</p> <p>---</p>	5
P, X	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS Vol. 94, No. 4; 15 August 1992 Philadelphia, PA, US; abstract no. 37307 W. HOLZGREVE ET AL. "Fetal cells in the maternal circulation.", pages AB-241; see abstract & J. REPROD. MED. Vol. 37, No. 5, 1992, pages 410 - 418; cited in the application</p> <p>---</p>	1-9
P, X	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS Vol. 94, No. 4; 15 August 1992 Philadelphia, PA, US; abstract no. 37313 D. GAENSHIRT-AHLERT "Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood"; page AB-242; see abstract & AM. J. OBSTET. GYNECOL. Vol. 166, No. 5, 1992, page 1350 - 1355</p> <p>-----</p>	1-9

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

DE 9300427
SA 73894

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 10/08/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9006509	14-06-90	AU-B-	621694	19-03-92
		AU-A-	4646689	26-06-90
		CA-A-	2004592	06-06-90
		EP-A-	0447424	25-09-91
		JP-T-	4502060	09-04-92
EP-A-0079696	25-05-83	US-A-	4434156	28-02-84
		CA-A-	1179952	25-12-84
		DE-A-	3278203	14-04-88
		JP-A-	58083632	19-05-83

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/DE 93/00427

Internationales Aktenzeichen

I. KLASSEKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 G01N33/543; B03C1/00	G01N33/80;	C12Q1/68;	G01N33/577
-----------------------------------	------------	-----------	------------

II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete

Recherchierte Mindestprüfstoff⁷

Klassifikationssystem	Klassifikationsymbole		
Int.Kl. 5	G01N ;	C12Q ;	C07K

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

Art. ^a	Kenzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	WO,A,9 006 509 (THE FLINDERS UNIVERSITY OF SOUTH AUSTRALIA) 14. Juni 1990 siehe das ganze Dokument	1,4,7,9
Y	---	2,3,5,6, 8
Y	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. Bd. 131, 1990, NEW YORK US Seiten 147 - 149 N. M. BHAT ET AL. 'One step separation of human fetal lymphocytes from nucleated red blood cells' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	3,5,8
	---	-/-

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "T" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfahrung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfahrung kann nicht als neu oder auf erfunderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfahrung kann nicht als auf erfunderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. AUGUST 1993

Abschlußdatum des internationalen Recherchenberichts

25. 08. 93

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevoilimächtigten Bediensteten

GRIFFITH G.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/DE 93/00427

Internationales Aktenzeichen

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP,A,0 079 696 (THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 25. Mai 1983 siehe Ansprüche 1-2 ---	2,6
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 17, 22. Oktober 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 150231, G. N. P. VAN MUIJEN ET AL. 'Monoclonal antibody PAL-M1 recognizes the transferrin receptor and is a progression marker in melanocytic lesions' Seite 579 ; Spalte 1 ; siehe Zusammenfassung & J. INVEST. DERMATOL. Bd. 95, Nr. 1, 1990, Seiten 65 - 69 ---	2,6
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 114, no. 21, 27. Mai 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 205143, P. BJOERCK ET AL. 'Expression of CD40 and CD43 during activation of human B lymphocytes' Seite 632 ; Spalte 1 ; siehe Zusammenfassung & SCAND. J. IMMUNOL. Bd. 33, Nr. 2, 1991, Seiten 211 - 218 ---	5
P,X	BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 94, no. 4 , 15. August 1992, Philadelphia, PA, US; abstract no. 37307, W. HOLZGREVE ET AL. 'Fetal cells in the maternal circulation.' Seite AB-241 ; siehe Zusammenfassung & J. REPROD. MED. Bd. 37, Nr. 5, 1992, Seiten 410 - 418 in der Anmeldung erwähnt ---	1-9
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 93/00427

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art o	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 94, no. 4 , 15. August 1992, Philadelphia, PA, US; abstract no. 37313, D. GAENSHIRT-AHLERT 'Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood' Seite AB-242 ; siehe Zusammenfassung & AM. J. OBSTET. GYNECOL. Bd. 166, Nr. 5, 1992, Seiten 1350 - 1355</p> <p>-----</p>	1-9

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

DE 9300427
SA 73894

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

10/08/93

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9006509	14-06-90	AU-B- 621694 AU-A- 4646689 CA-A- 2004592 EP-A- 0447424 JP-T- 4502060	19-03-92 26-06-90 06-06-90 25-09-91 09-04-92
EP-A-0079696	25-05-83	US-A- 4434156 CA-A- 1179952 DE-A- 3278203 JP-A- 58083632	28-02-84 25-12-84 14-04-88 19-05-83